УДК 57.085.23

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO КИЗИЛЬНИКА ДАММЕРА (COTONEASTER DAMMERII C.K. SCHNEID)

[1]Карпеченко К.А., [1]Землянухина О.А., [2]Моисеева Е.В., [2]Баранова Т.В., [2]Калаев В.Н., [1]Веприцев В.Н., [1]Карпеченко Н.А., [1]Карпеченко И.Ю., [1]Кондратьева А.М.

[1]ФГУП «Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции», Воронеж, e-mail: leo-silva@rambler.ru;

[2]ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Подобраны условия для введения кизильника Даммера в стерильную пробирочную культуру in vitro: способ стерилизации, тип первичного эксплантa, солевой и гормональный состав сред. Исследован ряд питательных сред для культивирования с целью определения наиболее оптимальных для поддержания и мультипликации in vitro. Были испробованы два варианта обеззараживания первичных эксплантов. Результаты показали, что только 7% растений, обработанных стерилизующим раствором, содержащим только «Белизну» в высокой концентрации, сохранились после двух недель культивирования. Во втором случае процент жизнеспособных эксплантов составил 69%. Таким образом, меньшая концентрация хлорсодержащего агента и мертиолят в обеззараживающем растворе способствуют лучшему избавлению от инфекции. Отработана методика избавления эксплантов кизильника Даммера от остаточной эндогенной инфекции путем отделения верхней части растущего побега от зараженного эксплантa и помещения на свежую среду того же состава. Определены условия индукции корнеобразования в культуре in vitro. Подобраны факторы, необходимые для адаптации пробирочных растений в условиях закрытого грунта с целью их дальнейшего роста в открытом грунте. Полученные растения кизильника не имеют эндогенной инфекции, не витрифицированы, обладают хорошим ростом и развитием побегов и корневой системы.

Ключевые слова: кизильник Даммера, введение in vitro, микроклональное размножение, культура тканей, эксплант, питательная среда, стерилизация, корнеобразование

INTRODUCTION TO THE CULTURE IN VITRO COTONEASTER DAMMERII C.K. SCHNEID

[1]Karpechenko K.A., [1]Zemlianukhina O.A., [2]Moiseeva E.V., [2]Baranova T.V., [2]Kalaev V.N., [1]Veprintsev V.N., [1]Karpechenko N.A., [1]Karpechenko I.Y., [1]Kondratieva A.M.

[1]Research Institute of Forest Genetics and Breeding, Voronezh, e-mail: leo-silva@rambler.ru;

[2]Voronezh State University, Voronezh, e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

The conditions for the introduction of cotoneaster Dummeri in a sterile test-tube cultures in vitro: the mode of sterilization, the type of primary explant, saline and hormonal composition of media. It has been investigated a number of culture media to determine the most optimal for the maintenance and multiplication in vitro. It has been tested two versions of decontamination of the primary explants. The results have been showed that 7% of the plants treated with a sterilizing solution containing only the «whiteness» in a high concentration remained after two weeks of culturing. In the second case, the percentage of viable explants was 69%. Thus, the lower the concentration of chlorine-containing agent and the disinfectant solution mertiolyat to contribute to a better freedom from infection. It has been treated a technique for getting rid of explants cotoneaster Dummer of residual endogenous infection by removing the upper part of the growing shoots of the infected premises and the explant to fresh medium of the same composition. The conditions for induction of rooting in culture in vitro have been determined. It has been selected factors necessary to adapt the test-tube plants in greenhouses for their further growth in the open field. The resulting plants of cotoneaster do not have a endogenous infection, were not vitrified, have good growth and development of shoots and roots.

Keywords: Cotoneaster Dammerii, in vitro introduction, microclonal multiplication, tissue culture, explants, cultural media, sterilization, rooting

Кизильник Даммера (*Cotoneaster Dammerii* C.K. Schneid.) относится к семейству розоцветных (*Rosaceae* Juss.). Это вечнозеленое растение со стелющимися и часто укореняющимися ветвями. Листья эллиптические до эллиптически-продолговатых, сверху голые блестящие, снизу бледнее, серовато-зеленые. Цветки белые, обычно одиночные на короткой цветоножке. Плоды почти шаровидные, ярко-красные. Цветет в мае – июне, плодоносит в сентябре – октябре. Область распространения – Китай. Успешно используется на каменистых горках, откосах, подпорных стенках, где кизильник Даммера очень эффектен своими длинными стелющимися ветвями [1, 2, 3, 4, 5]. В условиях ботанического сада им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета кизильник Даммера является засухоустойчивым и зимостойким растением, не требующим укрытия на зиму.

Целью настоящей работы была разработка метода микроклонального размножения кизильника Даммера для получения ма-

териала, пригодного для создания растущих плантаций.

Материалы и методы исследования

Материал для введения в культуру *in vitro*, ветви кизильника, брали в осенний период в Ботаническом саду им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского госуниверситета. Типом первичного эксплантa был выбран стеблевой сегмент, содержащий пазушную или апикальную почку (рис. 1).

Стерилизацию исходного материала проводили следующим образом: побеги тщательно мыли под проточной водой мягкой губкой с бытовым моющим средством, затем с кизильника срезали листья на половину длины. После этого ветви нарезали на сегменты. Полученные участки стебля с междоузлиями помещали в стеклянную емкость, заливали водопроводной водой, добавляли каплю бытового моющего средства, накрывали марлей и качали на качалке 10 мин. После этого, не снимая марли, материал на 20 мин ставили под проточную воду. По истечении этого времени в емкость с побегами заливали дистиллированную воду и снова качали 10 мин. Следующие этапы проводили в стерильных условиях: материал обрабатывали стерилизующими растворами, после чего по 5 мин троекратно отмывали в стерильной дистиллированной воде на качалке.

Рис. 1. Первичные экспланты с регенерантами из почек

Поскольку кизильник Даммера – вечнозеленое растение, осенний материал сильно инфицирован. Для обеззараживания первичных эксплантов поверхностную стерилизацию проводили двумя способами. В первом случае материал помещали на 15 мин в раствор отбеливателя «Белизна» в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1:3 соответственно. Второй способ отличается тем, что использовали 4%-й раствор «Белизны», содержащий 0,04% мертиолята, и стерилизовали 20 минут.

После завершения этапа обеззараживания, побеги нарезали в ламинаре на стеблевые сегменты с одной пазушной почкой и сажали в пенициллиновые пузырьки на питательную среду WPM, половинную по макросолевому составу (1/2 WPM) с добавлением 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л гиббереллoвой кислоты ($ГА_3$).

Для поддержания и мультипликации кизильника в пробирочной культуре использовали среду 1/2 WPM с добавлением 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л $ГА_3$ или половинную по макросолевому составу среду Мурасиге и Скуга (1/2 MS) [6].

У многих эксплантов на базальной части побега развивалась эндогенная инфекция, от которой при первичной стерилизации невозможно в некоторых случаях полностью избавиться. Для сохранения материала срезали верхнюю часть растущего побега и сажали на среду прежнего состава. Это позволяло выращивать растения из стерильной меристемы эксплантa.

Результаты исследования и их обсуждение

Материал для введения кизильника Даммера в стерильную пробирочную культуру *in vitro* брали в осенний период, что отчасти объясняет трудности получения стерильных эксплантов.

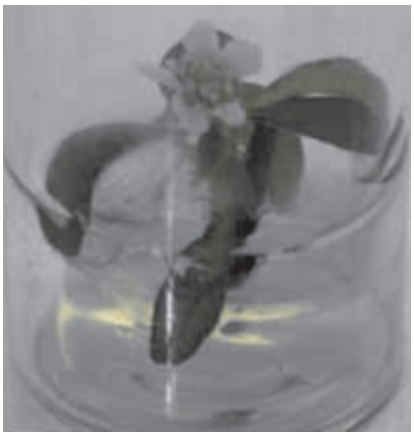
Были испробованы два варианта обеззараживания первичных эксплантов. Результаты показали, что только 7% растений, обработанных стерилизующим раствором, содержащим только «Белизну» в высокой концентрации, сохранились после двух недель культивирования. Во втором случае процент жизнеспособных эксплантов составил 69%. Таким образом, меньшая концентрация хлорсодержащего агента и мертиолят в обеззараживающем растворе способствуют лучшему избавлению от инфекции.

В качестве первичного экспланта использовали узловой сегмент с одной или двумя почками. На начальном этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Для образования регенерантов все экспланты помещали на половинную по макросолевому составу среду WPM с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л гиббереллoвой кислоты. Для избавления от эндогенной инфекции, проявлявшейся в базальной части многих первичных эксплантов, регенерант, выросший из меристемы почки, срезали и переносили на питательную среду того же состава. Чтобы не допустить высыхания среды и из-за накопления продуктов жизнедеятельности вокруг погруженной части, экспланты каждую неделю пересаживали на свежие среды.

Было замечено, что добавление 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л $ГА_3$ приводит к развитию адвентивных медленнорастущих побегов, а на безгормональной ½ MS происходит активный рост апикальной меристемы главного побега экспланта, что приводит к образованию вытянутого растения с хорошо развитыми листьями и слабым ветвлением. Интересным представляется факт развития цветочных почек и цветение двух образцов в пенициллиновом пузырьке с питательной средой 1/2 WPM + 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л $ГА_3$ (рис. 2).

а

б



в

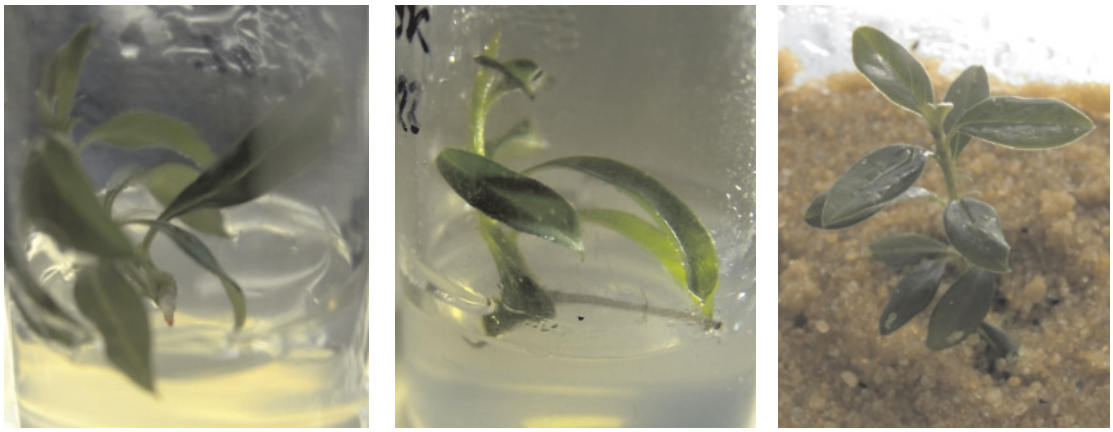
Рис. 2. Экспланты кизильника Даммера:
а – образование множественных побегов; б – рост единичного побега; в – цветение in vitro

После трех недель депонирования на описанных средах было получено необходимое для отработки следующего этапа количество эксплантов. Часть растений была пересажена на среды, отличающиеся от исходных гормональным составом: 1/2 WPM + 3 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и ½ WPM + 5 ИУК. Через две недели у 5% побегов первого и 30% второго варианта образовались и развились корни (рис. 3).

Укоренившиеся растения *in vitro* были переведены в условия *in vivo* (культуры закрытого грунта): посажены в прозрачные

пластиковые контейнеры с песком, прогретым в микроволновой печи 30 мин.

На этом этапе происходят многие изменения: переход растений с гетеротрофного на автотрофное питание, развитие устьичного аппарата, адаптация к более сухому воздуху, перепаду температур, утолщение кутикулы и т.п. Эта процедура необходима для пробирочных растений перед помещением их в условия открытого грунта.



а б в

Рис. 3. Перевод растений кизильника Даммера из культуры in vitro в условия закрытого грунта: а – корнеобразование у эксплантов на среде, дополненной ИУК; б – адаптация к тепличным условиям

Заключение

Кизильник Даммера – декоративное вечнозеленое растение, эндемик гор центрального Китая, имеет широкое применение в декоративном озеленении. В литературе имеется лишь одно упоминание о микроклональном размножении кизильника, но другого вида – кизильника горизонтального [7]. Нами была подобрана методика стерилизации исходного растительного материала, получены растения *in vitro* и оптимизированы среды, наиболее подходящие для поддержания и множественной мультипликации в стерильной пробирочной культуре. Выяснено, что для индукции корнеобразования необходимо выдерживание растений на средах, содержащих 5 мг/л ауксина β-индолилуксусной кислоты – фитогормона, стимулятора роста растений. Укоренившиеся *in vitro* растения успешно адаптированы в закрытом грунте и могут быть использованы для высадки в питомники, на открытые земельные участки.

Работа выполнена в рамках и при поддержке государственного контракта на выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» № 16.518.11.7099.

Список литературы

1. Гревцова А.Т., Казанская Н.А. Кизильники в Украине. – Киев: Нива, 1997. – 192 с.
2. Деревья и кустарники. – М., Л-д.: изд-во акад. Наук СССР. – Т. III. – С. 872.
3. Курбанов М.Р. Качество семян кизильников, интродуцированных на Апшероне // Биология семян, интродуцированных растений. – М.: Наука, 1985. – С. 45–49.
4. Пояркова А.И. Cotoneaster Medic // Флора Узбекистана. – Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1955. – Т.3. – С. 265–267.
5. Пояркова А.И. Новые виды кизильника для флоры Советского Союза и Китая // Ботанические материалы Гербария Ботанического института им. В.Л. Комарова АН СССР. – Л., 1961. – Т. 21. – С. 161–205.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
7. Sayed S. Sawsan and El-Karim, Seham G. (2007). Propagarion of *Cotoneaster horizontalis* Decne through *in vitro* culture. – Annals of Aric. Sc., Moshtohor, 2007. – Vol. 45, №2. – P. 761–772.

References

1. Grevtsova A.F., Kazanskaya N.A. *Kizilniki v Ukraine*. [Cotoneaster in Ukraine]. Kiev: Niva, 1997. 195 p.
2. Derevya I kustarniki. [Trees and shrubs]. Moskow, Leningrad: izdatelstvo akademii nauk SSSP. Vol. III. 872 p.
3. Kurbanob M.P. Kachestvo semyan kizilnikov, introduschirovannyx na Apsherona: Biologiya semyan, introdutsirovannyx rasteniy. [*Quality seeds cotoneaster, introduced in Absheron: Biology of seeds of introduced plants*]. Nayka, 1985. pp. 45–49.
4. Poyarkova A.I. Cotoneaster Medic.: Flora Uzbekistana [Cotoneaster Medic.: Flora of Uzbekistan]. Tashkent, 1955. Vol. 21. pp. 161–205.
5. Poyarkova A.I. Yjdye vidy kizilnika dlya flory Sovetskogo Coyuza I Kitaya: Botanicheskie materialy gerbariya Botanicheskogo instityta ivtyb V.L. Komarova AN SSSP. [*New species of cotoneaster to the flora of the Soviet Union and China: Botanical materials Herbarium of the Botanical Institute. Komarov, Academy of Sciences of the USSR*]. Leningrad,1961. Vol. 21. pp. 161–205.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962. V. 15. pp. 473–497.
7. Sayed S. Sawsan and El-Karim, Seham G. Propagarion of *Cotoneaster horizontalis* Decne through *in vitro* culture. Annals of Aric. Sc., Moshtohor, 2007. V.45, no. 2. pp. 761–772.

Рецензенты:

Дурнова Н.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов;

Полуконова Н.В., д.б.н., профессор кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 06.04.2012.